

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 19 MAY 2003

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
 einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 48 318.3

Anmeldetag: 16. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Volker A. Erdmann und Thorsten Lamia, Berlin/DE

Bezeichnung: Streptavidin Bindungspeptid

IPC: C 07 K 5/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
 Im Auftrag

Dzierzon



Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Streptavidin-Bindungspeptid, sowie Verfahren zur Herstellung eines Streptavidin-Bindungspeptides in einem zellbasierten oder zellfreien
5 Proteinbiosynthesesystem.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides zur Aufreinigung eines in einem Proteinbiosynthesesystem hergestellten definierten
10 Proteins, sowie die Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides zur Markierung eines definierten Proteins.

Stand der Technik

15 Verfahren zur effizienten Expression von definierten Proteinen in verschiedensten pro- und eukaryontischen Organismen sind bekannt und bedürfen keiner weiteren Erläuterung. Unter definierten Proteinen werden in diesem Zusammenhang Peptide und/oder Proteine verstanden, die in dem
20 zur Expression verwendeten Organismus oder zellfreien Expressionssystem natürlicherweise oder nach Transformation bzw. Einsatz definierter RNA exprimiert und in Aufreinigungsschritten angereichert werden.
25 Verfahren zur zellfreien Expression von definierten Proteinen sind beispielsweise aus den Literaturstellen EP 0312 617 B1; EP 0401 369 B1 und EP 0 593 757 B1 bekannt. Demgemäß werden die für eine Transkription und/oder Translation notwendigen Komponenten neben einem für ein definiertes Protein kodierenden Nukleinsäurestrang in einem
30 Reaktionsgefäß inkubiert und nach der Expression die Polypeptide/Proteine aus der Reaktionslösung isoliert. Sowohl die für die Transkription, als auch die für die

Translation notwendigen Komponenten lassen sich aus den Überständen pro- oder eukaryontischen Zelllysaten nach einer Zentrifugation gewinnen.

5 Ein wesentliches Problem bei der Expression von definierten Proteinen in pro- und eukaryontischen Organismen und bei der zellfreien Expression liegt in der Aufreinigung und/oder der Detektion der exprimierten definierten Proteine. Dies ist insbesondere bei definierten Proteinen 10 problematisch, für die es keine Antiseren oder monoklonale Antikörper gibt. Zur Vereinfachung der Aufreinigung und der Detektion solcher definierten Proteine werden diese als sogenannte Fusionsproteine exprimiert. Hierbei wird dem definierten Protein N- und/oder C-terminal eine Amino- 15 sauresequenz angefügt oder zwischen zwei Proteindomänen (intern) eingefügt, der Fusionspartner. Dies geschieht auf der Nukleinsäureebene, so daß sowohl das definierte Protein, als auch der zur Detektion und/oder Reinigung angefügte Fusionspartner während eines Transkriptions-/Translati- 20 onsvorganges zusammen als ein chimäres (Fusions-) Protein exprimiert werden, bestehend aus dem definierten Protein und dem Fusionspartner. Hierbei kann es sich bei dem angefügten Fusionspartner um einzelne Aminosäuren, aber auch um Peptide oder Proteine handeln. Für diese angefügten 25 Fusionspartner stehen zur Aufreinigung immobilisierte Bindungspartner zur Verfügung, mit denen die Fusionsproteine isoliert werden können. Neben der Möglichkeit der Reinigung der Proteine können diese auch mit für den Fusionspartner spezifischen Bindungspartner nachgewiesen werden. 30 Diese Bindungspartner können für den Fusionspartner spezifische Antikörper oder auch andere Proteine, Peptide oder chemische Verbindungen sein, die an den Fusionspartner spezifisch binden.

Beispiele für solche Fusionspartner sind der Myc-tag (Munro & Pelham (1986) Cell 46, 291-300; Ward et al. (1998) Nature 341, 544-546), das Flag Peptid (Hopp et al. 5 (1988) Bio/Technology 6, 1204-1210), das KT3 Epitop Peptid (Martinet et al. (1990) Cell 63, 843-849; Martin et al. (1992) Science 255, 192-194) und das alpha-tubulin Epitop Peptid (Skinner et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 14163-14166), die alle erfolgreich für die Detektion und 10 teilweise auch für die Reinigung von Proteinen genutzt wurden. Es konnte für einen Teil der Fusionspartner, die normalerweise 3 bis 12 Aminosäuren lang sind, gezeigt werden, daß sie nicht die biologische Funktion der definierten Proteine beeinflussen. Die biologische Funktion des 15 definierten Proteins wird dagegen mit zunehmender Länge des Fusionspartners beeinflußt, da die zusätzlich exprimierten Aminosäuren z. B. die Ausbildung der Sekunder-, Tertiär und/oder Quartärstruktur beeinflussen können. Längere Fusionspartner sind daher zur Detektion der Proteine, aber weniger zur Reinigung der Proteine geeignet. 20 Auf der anderen Seite weisen längere Fusionspartner oft eine höhere Affinität mit ihren spezifischen Bindungspartnern auf.

25 Ein wesentlicher Nachteil der oben genannten Fusionspartner bei der Aufreinigung ist darin begründet, daß die Bindung an den Bindungspartner auf einer Antigen/Antikörperbindung beruht und die Herstellung und Reinigung der als Bindungspartner genutzten Antikörper aufwendig und teuer 30 ist. Ein weitere Nachteil liegt darin begründet, daß die Antigen/Antikörperbindung eine sehr starke Bindung zwischen dem Bindungspartner, z. B. an eine Matrix immobilisierten Antikörper, und dem Fusionspartner bedingt. Diese

hat zur Folge, daß bei der Elution der über den Fusionspartner gebundenen Fusionsproteine, teilweise extrem unphysiologische Bedingungen bezogen auf das definierte Protein geschaffen werden müssen. Unter unphysiologischen 5 Bedingungen sind in diesem Zusammenhang Bedingungen zu verstehen mit z. B. sehr hohe oder äußerst geringe Salzkonzentrationen, Einsatz von chaotropen Salzen und pH-Werte, die weit von dem natürlichen pH-Wert des definierten Proteins abweichen. Diese kann u. U. die Struktur und 10 Funktionalität des definierten Proteins beeinflussen oder irreversibel zerstören. Dementsprechend sollte die Reinigung der definierten Proteine unter möglichst schonenden, physiologischen Bedingungen geschehen, um die Funktionalität der Proteine zu erhalten. Zwar konnte bei 15 drei der oben genannten Fusionspartnern (Hopp et al. (1988) (Martin et al. (1990) (Skinner et al. (1991)) eine Elution auch unter schonenden Bedingungen mittels kompetetiver Peptide erzielt werden, doch bleibt das Problem der aufwendig und teuer herzustellenden und zu reini- 20 genden (als Bindungspartner dienenden) Antikörper und deren Bindung an die Matrix.

Weitere Fusionspartner, bestehend aus 8 bis 9 Aminosäuren, sind aus den Literaturstellen US 5,506,121 und Schmidt & 25 Skerra (Protein Engineering, vol. 6, no. 1, 109-122, 1993) bekannt. Die dort offenbarten Fusionspartner sind in der Lage an das Streptavidin oder an das "core" Streptavidin, ein proteolytisch gespaltenes Produkt des Streptavidin, zu binden (Bayer et al. (1989) Biochem. J. 259, 369-376).
30

Alle bekannten Fusionspartner, die an das Streptavidin binden enthalten die Aminosäureabfolge HPQ, das sog. HPQ-Bindungsmotiv, welches mit der Biotin-Bindungstasche des

Streptavidin in Wechselwirkung tritt. Zu den Bereits bekannten Peptiden gehören dem sog. Strep-tag I: AWRHPQFGG mit einer Dissoziationskonstanten Kd von 10-37 µM, der sog. Strep-tag II: WSHPQFEK mit einer Dissoziationskonstanten Kd von 18-72 µM und der sog. SBP-tag: MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHHPQGQREP mit einer Dissoziationskonstanten Kd von 2,5 nM. Im Gegensatz zu den beiden kurzen Strep-tags I und II besitzt der längere SBP-tag eine wesentlich stärkere Bindung zum Streptavidin. Allerdings wird, wie oben ausgeführt, die Funktion des definierten Proteins insbesondere mit zunehmender Länge des Fusionspartners beeinflußt. Auch stören besonders lange Fusionspartner bei der Kristallisation der definierten Proteine.

15

Technisches Problem der Erfindung

20 Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein möglichst kurzes Streptavidin-Bindungspeptid mit einer starken Bindung zum Streptavidin zur Verfügung zu stellen.

25 Grundzüge der Erfindung und bevorzugte Ausführungsformen.

Zur Lösung des technischen Problems lehrt die Erfindung ein Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 6.

Mit dem erfindungsgemäßen Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 6

wird, verglichen mit dem Stand der Technik, eine wesentlich stärkere Bindung zwischen dem Streptavidin-Bindungspeptid und dem Streptavidin erreicht, bzw. kann bei gleicher Bindungsstärke das Streptavidin-Bindungspeptid wesentlich 5 verkürzt werden.

Des Weiteren lehrt die Erfindung ein Nukleinsäure codierend für ein Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 6, sowie ein Plasmid enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure. Es versteht sich, daß die Nukleinsäure codierend für ein erfindungsgemäßes Streptavidin-Bindungspeptid und/oder das Plasmid dem jeweiligen Expressionssystem/ Proteinbiosynthesesystem angepaßt werden kann. Das Plasmid kann als ein Expressionsvektor, insbesondere für Bakterien, ausgelegt sein enthaltend einen Bereich mit mindestens einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, in dem die Nukleinsäuresequenz codierend für ein definiertes Protein inseriert werden kann und somit das definierte Protein zusammen mit dem Streptavidin-Bindungspeptide gemäß 20 Seq.-ID 1 - 6 exprimiert wird. Es versteht sich, daß der für das definierte Protein und für das Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 6 codierende Bereich sich unter der Kontrolle eines geeigneten Promoters und/oder Operators und Terminators befinden. Der Bereich mit mindestens einer Schnittstelle für mindestens ein Restriktionssenzy 25 kann sowohl in 5', als auch in 3' Richtung vom Nukleinsäurebereich codierend für das Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 6 liegen. Der Nukleinsäurebereich codierend für das Streptavidin-Bindungspeptide gemäß 30 Seq.-ID 1 - 6 muß nicht unmittelbar an den Nukleinsäurebereich codierend für das definierte Protein anschließen, vielmehr können zwischen den beiden Bereich noch

Nukleinsäuren liegen, die für 1 bis 20 Aminosäuren, insbesondere für 5 bis 10 Aminosäuren, codieren.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 6, wobei eine Nukleinsäure in einem zellbasierten oder zellfreien Proteinbiosynthesesystem exprimiert oder überexprimiert wird. Dieses so hergestellte Peptid läßt sich leicht über die Bindung an Streptavidin isolieren. Das erhaltene Translationsprodukt, i. e. ein Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 6, wird mit immobilisiertem Streptavidin kontaktiert und daran gebunden. Nach Abtrennung der Lösung mit nicht an Streptavidin gebundenen Substanzen wird das Translationsprodukt eluiert. Als Elutionsmittel können Puffer verwendet werden, die Biotin oder verwandte Substanzen und/oder Derivate, wie Iminobiotin, Desthiobiotin und/oder Diaminobiotin, enthalten. Das erhaltene Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 6 trägt im Falle der Fusion mit dem definierten Protein dieses Protein. Es kann der auch unabhängig von einem definierten Protein zur Antikörperherstellung genutzt werden. Die erhaltenen Antikörper können z. B. zur Detektion oder zur Aufreinigung der Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 6, bzw. im Fall, daß das Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 6 als Fusionspartner eingesetzt wird, des an diesen Fusionspartner gebundenen definierten Proteins genutzt werden.

Es versteht sich, daß die Herstellung eines solchen Streptavidin-Bindungspeptides enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 6 z. B. auch mittels chemischer Festphasensynthese, beispielseise mit einem Syntheseautomat der Firma Abimed (Langenfeld, BRD) möglich ist. Diese Methode

basiert auf den Standardprotokollen der Fmoc-Chemie
(Fmoc=9-fluorenylmethoxycarbonyl).

Die Erfinung betrifft auch die Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 6 zur Aufreinigung eines in einem Proteinbiosynthesesystem hergestellten definierten Proteins, wobei eine für das definierte Protein und, hiermit verbunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende Nukleinsäure einer Transkription und/oder der Translation unterworfen wird, wobei eine Lösung enthaltend das so erhaltene Translationsprodukt mit immobilisiertem Streptavidin kontaktiert und daran gebunden wird und wobei nach Abtrennung der Lösung mit nicht an Streptavidin gebundenen Substanzen das Translationsprodukt eluiert wird. Die Elution kann unter schonenden Bedingungen für das definierte Protein erfolgen. Als Elutionsmittel können Puffer verwendet werden, die Biotin oder verwandte Substanzen und/oder Derivate, wie Iminobiotin, Desthiobiotin und/oder Diaminobiotin, enthalten. Das hergestellte definierte Protein kann das als Fusionsspartner dienende Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 6 sowohl N- und/oder C-terminal enthalten.

Bei Verwendung einer Streptavidin-Sepharose-Säule kann das zu untersuchende definierte Protein mittels des als Fusionsspartner dienenden Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 6 an der Matrix immobilisiert und aus einem Gemisch von Molekülen, z.B. einem Zelllysat, isoliert werden.

30

Die Erfinung betrifft auch die Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 6 zur Markierung eines definierten Proteins, wobei eine für das definierte

Protein und, hiermit verbunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende Nukleinsäure einer Transkription und/oder Translation unterworfen wird, wobei das so erhaltene Translationsprodukt mit einem Streptavidin-Konjugat 5 enthaltend ein Reportermolekül kontaktiert und daran gebunden wird. Das markierte definierte Protein kann das zur Markierung dienende Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 6 N- und/oder C-terminal enthalten. Reportermoleküle können z. B. radioaktive und/oder radioaktiv markierte Substanzen sein. Es versteht sich, daß das Streptavidin als solches auch radioaktiv markiert und/oder radioaktiv sein kann; in diesem Fall kann auf ein Reportermolekül verzichtet werden. Reportermoleküle können auch fluoreszierende Substanzen oder Enzyme, wie z. B. alkalische 15 Phosphatase oder Peroxidase, sein. Durch solche mit einem Reportermolekül gekoppelte Streptavidinverbindungen lassen sich beispielsweise Proteine, die das Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 6 als Fusionspartner besitzen, auf einem Western-Blot oder im ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) nachweisen und/oder quantifizieren. Handelt es sich bei den definierten Proteinen um Bindungsproteine, können auf diese Weise auch an diese bindende andere Proteine nachgewiesen werden. Unter Bindungsproteine sind in diesem Zusammenhang Proteine zu verstehen, die selbst andere Proteine binden und/oder selber an 20 andere Proteine binden, wie z. B. bei einer Antigen/Antikörperbindung oder bei einer Bindung eines Proteins an einen Rezeptor.

25 Bevorzugt ist ein Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend weniger als 30 Aminosäuren, vorzugsweise weniger als 20 Aminosäuren, höchstvorzugsweise weniger als 10 Aminosäuren.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen darstellenden Figuren sowie Beispielen näher erläutert.

5

Fig. 1: Reinigung von FABP mit Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Motiv 3 als Fusionspartner nach zellfreier Proteinbiosynthese über eine Streptavidin-Affinitätssäule. Es wurden von jeder Fraktion eine vergleichbare Menge mittels 10 SDS-Polyacrylamidgelektrophorese analysiert. (A) Coomasie gefärbt und (B) Autoradiogramm. Die Proben in den nummerierten Spuren sind (1) Molekulargewichtsmarker; (2) Reaktionsmischung; (3) Durchlauf der Probenauftragung; (4-6) Waschfraktionen; (7-9) Elutionsfraktionen; (10) radioaktiver Molekulargewichtsmarker.

Fig. 2: Reinigung von FABP mit Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Motiv 3 als Fusionspartner nach zellfreier Proteinbiosynthese über eine StrepTactin-Affinitätssäule. Es 20 wurden von jeder Fraktion eine vergleichbare Menge mittels SDS-Polyacrylamidgelektrophorese analysiert. (A) Coomasie gefärbt und (B) Autoradiogramm. Die Proben in den nummerierten Spuren sind (1) Molekulargewichtsmarker; (2) Durchlauf der Probenauftragung; (3-5) Waschfraktionen; 25 (6-10) Elutionsfraktionen; (11) radioaktiver Molekulargewichtsmarker.

B Beispiel 1 : erfindungsgemäße Bindungspeptide und Ver-
30 gleichspeptide mit Dissoziationskonstanten

In fachüblicher Weise wurde das FAB Protein (fatty acid binding protein) aus Rinderherzen *in vitro* in einem

zellfreien Proteinbiosynthese mittels eines gekoppelten Transkriptions-Translationssystems exprimiert. Das exprimierte FAB Protein besaß am N-Terminus jeweils ein aus fünfzehn Aminosäuren bestehendes zusätzliches Streptavidin 5 Bindungspeptid mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen als Fusionspartner.

Zwei Bindungspeptide enthalten in ihrer Aminosäuresequenz das im Stand der Technik beschriebene HPQ-Motiv (Motiv 1 und 2) und zwei enthalten das erfindungsgemäße Streptavidin 10 din-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 6 (Motiv 3 und 4).

Die Sequenzen der Peptide sind in der Tabelle 1 dargestellt. Zusätzlich wurden die exprimierten Proteine mit einem am C-terminus befindlichen "His-tag", bestehend aus 6 Histidinen, versehen. Die Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie über Ni²⁺-IDA-Agarose in fachüblicher Weise aufgereinigt. Man erkennt, dass bei gleicher Länge Bindungspeptide mit einer erfindungsgemäßen Sequenz eine wesentlich niedrigere Dissoziationskonstante als ein Bindungspeptid mit HPQ-Motiv aufweist. Der Kd-Wert eines erfindungsgemäßen Bindungspeptids liegt in der Größenordnung des SBP-Tags trotz des ca. 2,5-fachen Länge des SBP-Tags.

Tabelle 1

	Sequenz	Dissoziationskonstante [kd]
Motiv 1	D L Y D I D R N W V G H P Q G	8 μM
Motiv 2	D N Y D A D L A W D T H P Q D	70 μM
Motiv 3	D V E A W L D E R V P L V E T	84 nM
Motiv 4	D V E A W I A D P A V H F T T	200 nM

Beispiel 2: Messungsweise der Dissoziationskonstanten aus Tabelle 1.

Die Messungen der Dissoziationskonstante wurden mit einem BiacoreX-System und dem Sensor Chip NTA der Firma Biacore durchgeführt. Vermessen wurden die aus der im Beispiel 1 beschriebenen Expression hervorgegangenen Proteine, d.h. FAB Proteine, die am N-Terminus jeweils ein aus fünfzehn Aminosäuren bestehendes Peptid als Fusionspartner und am C-Terminus 6 Histidine besaßen, die zur Immobilisierung auf dem Sensor Chip benötigt wurden. Die Bindungsaaffinität der aus der im Beispiel 1 beschriebenen Expression hervorgegangenen Proteine zu Streptavidin wurde nach Herstellerangaben im Biacore-Gerät vermessen. Dabei befindet sich das zu vermessende Protein auf dem Sensor-Chip und eine Streptavidinlösung mit definierter Konzentration wird eingespritzt. Die Wechselwirkung (Bindung) zwischen den beiden Molekülen wird vom Gerät gemessen und als sog. Resonanz Units (RU) angegeben. Zur Messung wurden die vom Hersteller angegebenen Puffer verwendet.

Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle 2 dargestellt. Die erhaltenen Meßwerte wurden mit der zugehörigen Software ausgewertet und führten zu den in der Tabelle 1 angegebenen Dissoziationskonstanten.

Tabelle 2:

Motiv	1	2	3	4
Streptavidinkonz.	RU	RU	RU	RU
15 nM			98	
30 nM			242	68
60 nM			461	171
125 nM			613	280
250 nM			704	384
500 nM	62		786	478
1 µM	123		-	560
2 µM	233		946	644
3 µM	-	64	-	
4 µM	407	-	983	
6 µM	-	98		
8 µM	621	-		
15 µM	-	201		
16 µM	779	-		
30 µM	-	337		
32 µM	955	-		
60 µM		536		

25

Beispiel 3

In fachüblicher weise wurde das FAB Protein, das am N-terminus ein aus fünfzehn Aminosäuren bestehendes zusätzliches Peptide mit der Aminosäuresequenz D V E A W L D E R V P L V E T (Motiv 3) als Fusionspartner besaß, *in vitro* in

einem zellfreien Proteinbiosynthese mittels eines gekoppelten Transkriptions-Translationssystems exprimiert.

Zur Aufreinigung des überexprimierten definierten Proteins wurde das Streptavidin an einer Festphase gekoppelt. Als 5 Festphase diente eine Sepharose. Das exprimierte FAB Protein wurde anschließend in fachüblicher Weise affinitätschromatographisch über eine Säule enthaltend Streptavidin-Sepharose oder StrepTactin-Sepharose aufgereinigt.

Für die Aufreinigung wurden folgende Puffer verwendet:

10 Waschpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA).

Für die Elution von Streptavidin enthielt der Waschpuffer 2 mM Biotin und für die Elution von StrepTactin enthielt 15 der Waschpuffer 2,5 mM Desthiobiotin.

Die prozentuale Verteilung des eingesetzten definierten Proteins auf die verschiedenen Fraktionen der Affinitätschromatographie ist in der Tabelle 3 zu entnehmen. In der 20 Tabelle 3 steht D für den Auftragung der Probe/Durchlauf, W für die Waschfraktion und E für die Elutionsfraktion.

Tabelle 3

Fraktion	D	W1	W2	W3	E1	E2	E3	E4	E5	Summe
Streptavidin	3,5%	6,8%	1,0%	0,3%	0,4%	76,9%	0,7%	-	-	89,6%
StrepTactin	3,0%	7,4%	1,8%	0,9%	0,9%	45,9%	23,2%	1,0%	0,3%	84,4%

Bei der Verwendung von Streptavidin-Sepharose konnten 90% des aufgetragenen Proteins von der Säule wiedergewonnen werden, wobei 78% auf das Eluat entfielen. Die Qualität der Aufreinigung ist in Fig. 1 dargestellt.

15

Bei der Verwendung von StrepTactin-Sepharose konnten 84% des aufgetragenen Proteins von der Säule wiedergewonnen werden, wobei 71% auf das Eluat entfielen. Die Qualität 5 der Aufreinigung ist in Fig. 2 dargestellt.

Seq.-ID 1: DVEAW

Seq.-ID 2: DVEA

Seq.-ID 3: VEAW

10 Seq.-ID 4: DVE

Seq.-ID 5: VEA

Seq.-ID 6: EAW

15

20

25

30

Das Bindungspeptid (FAX 3) mit der Sequenz DVEAWLDERVPLVET wurde einer Substitutionsanalyse unterzogen, wodurch ein etwaiges Minimalmotiv (=verkürztes Peptid) identifiziert und die Wirkung einzelner Aminosäureaustausche auf die Bindungsspezifität untersucht werden sollten. Bei einer Substitutionsanalyse werden Peptide mittels Spot-Verfahren (Frank, R. 1992) auf einer als Festphase dienenden Cellulosemembran synthetisiert. Dabei wurde jede Position des 15 Aminosäuren umfassenden Peptids systematisch durch die übrigen 19 L-Aminosäuren ersetzt.

Die Substitutionsanalyse wurde mit einem Peroxidase-markierten Streptavidin inkubiert und mit einem Lumineszenzsubstrat entwickelt. Dadurch konnte festgestellt werden wie weit sich das Peptid verkürzen lässt und welche Aminosäuren „konserviert“ und somit nicht oder nur sehr schlecht austauschbar sind. Es ergab sich folgendes Bild:

Das kürzeste Peptid, das noch eine Streptavidinbindung aufweist ist das 6-mer Peptid DVEAWL. Ein deutliche bessere Streptavidinbindung weist das 9-mer Peptid DVEAWLDER auf. Die Substitutionsanalyse wies auch auf Positionen hin, wo der Austausch der ursprünglichen gegen eine andere Aminosäure eine Verbesserung der Streptavidinbindung mit sich bringen könnte.

Die Informationen aus der Substitutionsanalyse wurden überprüft, indem die Bindungskonstanten verschiedener Peptide mittels „Oberflächen Plasmonen Resonanz“ Spektroskopie unter Verwendung eines BIACore-Gerätes bestimmt wurden. Die Messungen erfolgten mit dem NTA Sensor-Chip der Firma BIACore und mit Hilfe des fettsäurebindenden Proteins aus dem Rinderherzen (FABP). Das FABP diente zur Immobilisierung und Präsentation der Peptide. Weiterhin sollten so die bei einer Affinitätschromatographie auftretenden Bedingungen simuliert werden, da das Peptid zukünftig als Affinitätspeptid zur Aufreinigung von Proteinen verwendet werden soll. Im Gegensatz zu den ersten Messungen, wo die zu vermessenden Peptide die vier N-terminalen Aminosäuren des FABP ersetzten, war die Anordnung der Peptide diesmal ebenfalls N-terminal, aber sie waren nicht Teil des FABP. Auch der für die Immobilisierung notwendige His-tag wurde verändert. Er befand sich wie bei den ersten Messungen am C-Terminus des FABP, wurde aber von sechs auf acht Histidine erweitert und zudem durch einen aus zwei Glycinen bestehenden Linker vom FABP distanziert. Dadurch konnte die Immobilisierung der Liganden deutlich verbessert und somit die Drift der Basislinie, die aus dem Herunterwaschen des Liganden resultiert, minimiert werden. Für jede Messung wurde eine identische Menge des jeweiligen FABPs immobilisiert,

die einem Anstieg der Baselinie um 1100 Resonanzeneinheiten (RU) entsprach. Als Referenz diente das FABP mit dem His-tag, aber ohne N-terminales Bindungspeptid.

Die aus der optimierten Meßmethode hervorgehenden Bindungskonstanten waren folgende:

	K_d
Selektiertes Peptid (FAX 3): D V E A W L D E R V P L V E T (Asp Val Glu Ala Trp Leu Asp Glu Arg Val Pro Leu Val Glu Thr)	$3,6 \pm 0,6 \text{ nM}$

verkürztes Peptid (9-mer): DVEAWLDER	$240 \pm 40 \text{ nM}$
--------------------------------------	-------------------------

Einfluß anderer Aminosäuren auf das verkürzte 9-mer Peptid:

3 Asp:	DVDAWLDER	$940 \pm 140 \text{ nM}$
3 Gly:	DVGAWLDER	$570 \pm 90 \text{ nM}$
6 Phe:	DVEAWFDER	nicht meßbar
6 Arg:	DVEAWRDER	nicht meßbar
7 Gly:	DVEAWLGER	$17 \pm 4 \text{ nM}$
8 Ala:	DVEAWLDAR	$160 \pm 30 \text{ nM}$

Positiven Einfluß zeigen Glycin an Position 7 und Alanin an Position 8!

→ Kombination dieser beiden Aminosäuren

verkürztes Peptid:	DVEAWLGAR	$17 \pm 4 \text{ nM}$
--------------------	-----------	-----------------------

original Peptid mit Gly7:	DVEAWLGERVPLVET	$4,2 \pm 0,7 \text{ nM}$
---------------------------	-----------------	--------------------------

original Peptid:	DVEAWLGARVPLVET	$4,1 \pm 0,6 \text{ nM}$
------------------	-----------------	--------------------------

Das original 15-mer Peptid läßt sich nicht weiter verbessern. Das verkürzte 9-mer Peptid hingegen läßt sich durch ein Glycin anstelle der Asparaginsäure an Position sieben deutlich weiter verbessern. Auch das Alanin anstelle der Glutaminsäure an Position acht weist eine etwas bessere Bindungsaffinität gegenüber Streptavidin auf. Durch die Kombination dieser beiden Aminosäuren läßt sich zwar die Bindungsaffinität nicht weiter verbessern, aber sie verschlechtert sich auch nicht.

Die Erfindung umfaßt somit auch das verkürzte 9-mer Peptid mit seinen nicht bzw. nur wenig konservierten Positionen:

DVXAWLXXR (X= beliebeige Aminosäure)

Beispiele sind das verkürzte Peptid mit dem Glycin an Position sieben:

DVEAWLGER

und das verkürzte Peptid mit dem Glycin an Position sieben und dem Alanin an Position acht:

DVEAWLGAR

GESAMT SEITEN 31

Patentansprüche:

1. Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend eine Aminosäure-
5 sequenz gemäß Seq.-ID 1 - 6.

10 2. Nukleinsäure codierend für ein Streptavidin-Bindungs-
peptid nach Anspruch 1.

3. Plasmid enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 2.

15 4. Verfahren zur Herstellung eines Streptavidin-Bindungs-
peptides nach Anspruch 1, wobei eine Nukleinsäure nach
Anspruch 2 in einem zellbasierten oder zellfreien Pro-
teinbiosynthesesystem exprimiert oder überexprimiert
wird.

20 5. Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides nach
Anspruch 1 zur Aufreinigung eines in einem Proteinbio-
synthesesystem hergestellten definierten Proteins, wo-
bei eine für das definierte Protein und, hiermit ver-
bunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende
Nukleinsäure einer Transkription und/oder Translation
unterworfen wird, wobei eine Lösung enthaltend das so
erhaltene Translationsprodukt mit immobilisiertem
30 Streptavidin kontaktiert und daran gebunden wird und
wobei nach Abtrennung der Lösung mit nicht an Strepta-
vidin gebundenen Substanzen das Translationsprodukt
eluiert wird.

17

6. Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides nach Anspruch 1 zur Markierung eines definierten Proteins, wobei eine für das definierte Protein und, hiermit verbunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende Nukleinsäure einer Transkription und/oder Translation unterworfen wird, wobei das so erhaltene Translationsprodukt mit einem Streptavidin-Konjugat enthaltend eine Reportermolekül kontaktiert und daran gebunden wird.

10

15

20

25

30

18

Zusammenfassung

Die Erfindung lehrt neue Streptavidin-Bindungspeptide.

5

10

15

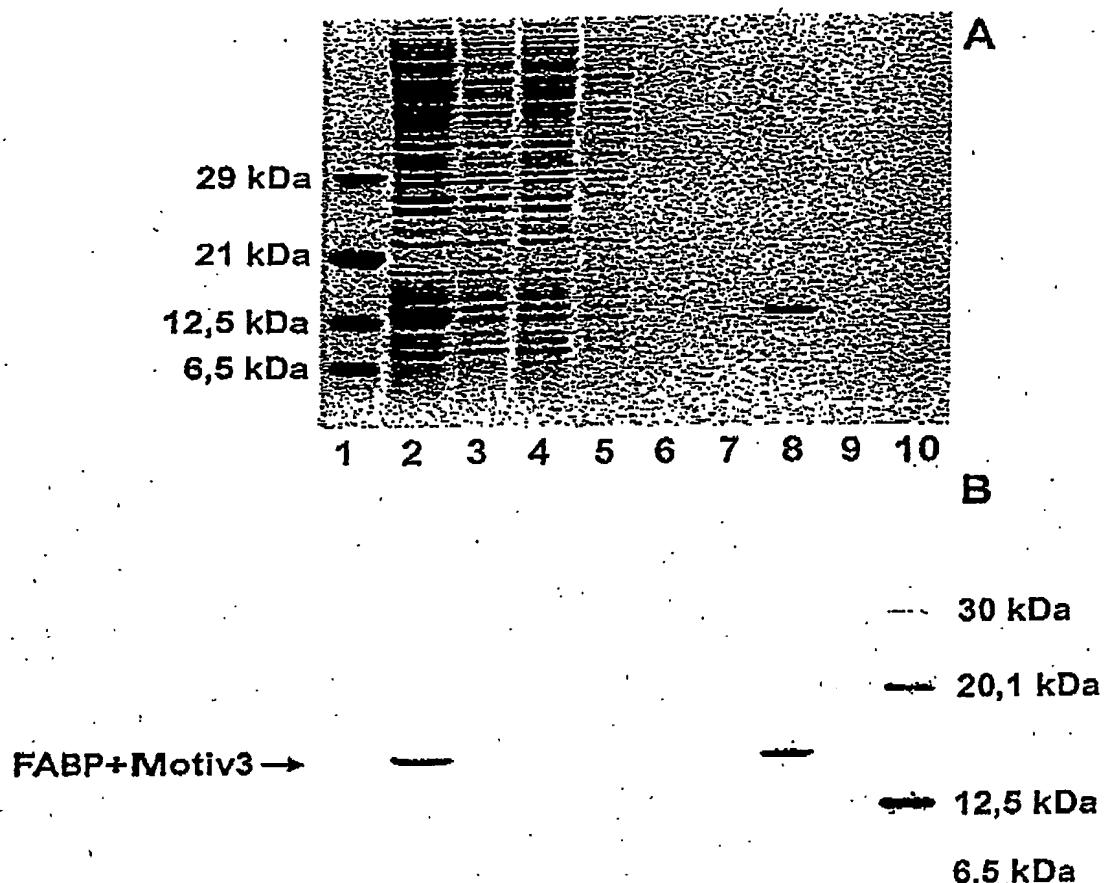
20

25

30

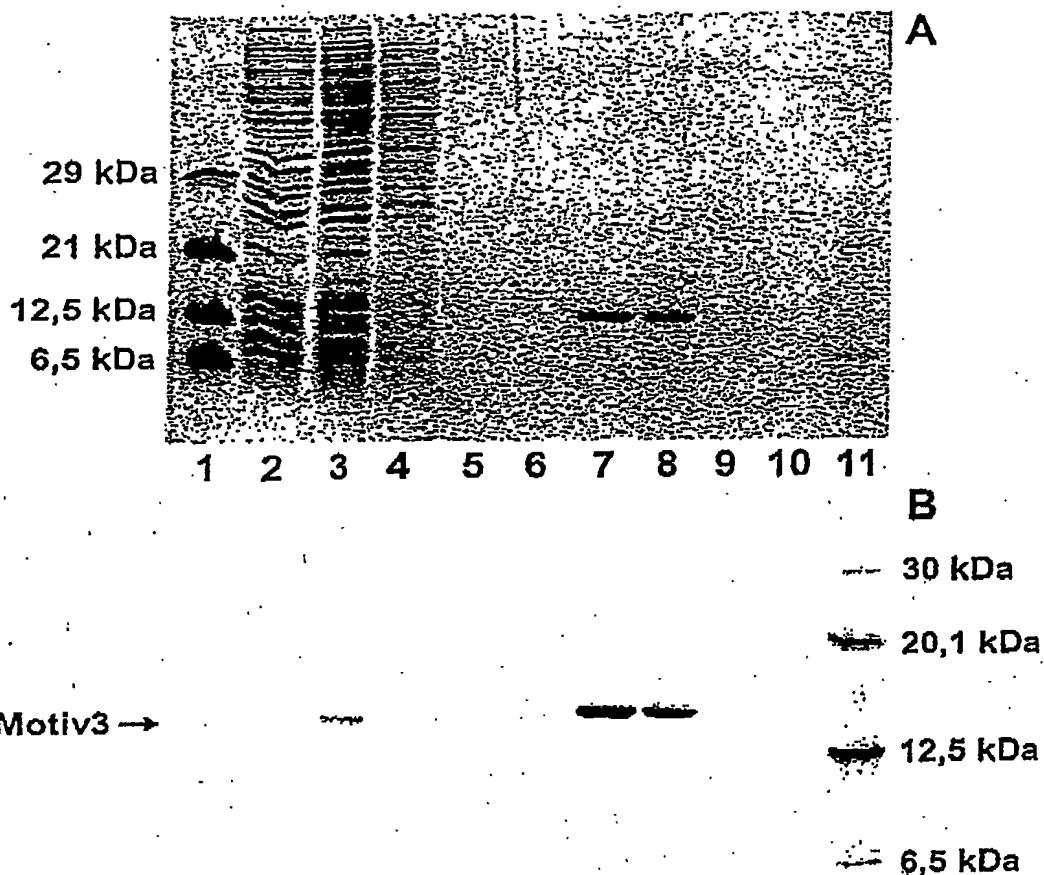
1/2

Fig. 1



2/2

Fig. 2



erd_de_0201.ST25.txt

SEQUENCE LISTING

<110> Erdmann, Volker A.
Lamla, Thorsten

<120> Streptavidin-Bindungspeptid

<130> ERD/DE/0201

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<400> 1

Asp Val Glu Ala Trp

1 5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<400> 2

Asp Val Glu Ala

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<400> 3

Val Glu Ala Trp

1

<210> 4

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial

<400> 4

Asp Val Glu

1

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> artificial

<400> 5

Val Glu Ala
1

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> artificial

<400> 6

Glu Ala Trp
1

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<400> 7

Asp Leu Tyr Asp Ile Asp Arg Asn Trp Val Gly His Pro Gln Gly
1 5 10 15

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<400> 8

Asp Asn Tyr Asp Ala Asp Leu Ala Trp Asp Thr His Pro Gln Asp
1 5 10 15

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<400> 9

Asp Val Glu Ala Trp Leu Asp Glu Arg Val Pro Leu Val Glu Thr
1 5 10 15

d_de_0201.ST25.txt

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<400> 10

Asp Val Glu Ala Trp Ile Ala Asp Pro Ala Val His Phe Thr Thr
1 5 10 15